利用 MiSeq 测序技术分析锦江牛瘤胃细菌多样性

高雨飞　欧阳克蕙*　瞿明仁　熊小文　温庆琪　许兰娇

（江西农业大学江西省动物营养重点实验室，营养饲料开发工程研究中心，南昌 330045）

摘　要：本研究旨在利用 MiSeq 高通量测序技术揭示锦江牛瘤胃细菌组成及多样性。选用 3 头装有永久性瘤胃瘘管的锦江牛成年公牛[体重（400±20） kg]，采集瘤胃液样品后提取细菌 DNA，对瘤胃细菌的 16S rDNA 序列 V4~V5 区进行 MiSeq 测序，分析物种的丰度、分布及 α-多样性。结果表明：3 个样本共获得 56 763 条高质量 16S rDNA 序列，946 个分类操作单元（OTU），锦江牛瘤胃细菌丰富度指数 Chao 指数、Ace 指数分别为 836、841，α-多样性指数 Shannon 指数、Simpson 指数分别为 4.96、0.021 5；经过物种注释，15 个门、23 个纲、26 个科以及 44 个属在所有样品中被鉴定。在门水平，拟杆菌门（Bacteroidetes）（64.37%）、厚壁菌门（Firmicutes）（21.20%）和变形菌门（Proteobacteria）（7.59%）数量最多；在纲水平，主要包括拟杆菌纲（Bacteroidia）（52.88%）和梭菌纲（Clostridia）（17.03%）；在科水平，主要包括普雷沃氏菌科（Prevotellaceae）（36.26%）、瘤胃菌科（Ruminococcaceae）（9.33%）和毛螺菌科（Lachnospiraceae）（4.89%）；在属水平，优势细菌主要包括普雷沃氏菌属（*Prevotella*）（28.97%）、帕拉普氏菌属（*Paraprevotella*）（3.08%）、理研菌属（*Rikenella*）（2.28%）、梭菌_Ⅳ（*Clostridium*_Ⅳ）（1.77%）、解琥珀酸菌属（*Succiniclastium*）（1.62%）和瘤胃球菌属（*Ruminococcus*）（1.53%）。结果证明，锦江牛瘤胃细菌多样性相对较低；锦江牛瘤胃中最优势菌门是拟杆菌门（Bacteroidetes），其次是厚壁菌门（Firmicute）；普雷沃氏菌属（*Prevotella*）是锦江牛瘤胃中最优势细菌属。

关键字：锦江牛；瘤胃细菌；多样性；MiSeq 测序

中图分类号：S823；S852.2

瘤胃微生物是指栖息在反刍动物瘤胃中的微生物，对反刍动物的生长，特别是消化代谢具有特殊的意义[1-2]。瘤胃微生物与反刍动物的共生现象由来已久，与宿主表现出共进化的特点[3]。因此，瘤胃微生物群落结构是常被用来反映宿主遗传背景的重要指标[4-6]。尤其

收稿日期：2015-07-13
基金项目：国家自然科学基金（31260561）；国家现代农业产业技术体系（nycytx-38）
作者简介：高雨飞（1990-），男，安徽淮北人，硕士研究生，从事反刍动物营养的研究。E-mail： nihaogyf@sohu.com
*通信作者：欧阳克蕙，教授，硕士生导师，E-mail： ouyangkehui@sina.com

是其中的瘤胃细菌，种类最为繁多、数量最为巨大，不仅是瘤胃微生物中最主要的功能群，而且，相比原虫而言，瘤胃细菌种群的种间差异要远远大于种内差异[6]，更能反映宿主品种的差异性。中国是拥有牛品种最多的国家，但目前在牛方面对瘤胃微生物的研究多以荷斯坦牛等大品种为研究对象[7-8]，对小品种牛，特别是我国特有的牛品种的瘤胃微生物群落结构及多样性的了解有限。锦江牛属于我国南方小型黄牛，具有耐热性好、耐粗饲、役力较强等特点，是极其宝贵的地方品种资源，主要分布于江西省西北部、锦江中游的低丘岗地和平原地区，2006 年调查存栏量超过 100 万头。目前对锦江牛的研究多集中在资源调查及营养调控上，对锦江牛瘤胃微生物的研究尚未见报道。本研究利用 MiSeq 高通量测序技术，分析锦江牛瘤胃菌群结构及多样性，旨在为我国南方黄牛种质资源的开发利用奠定基础，也为锦江牛微生态营养的深入研究提供参考。

1　材料与方法

1.1　样品采集

选择 3 头安装有永久性瘤胃瘘管的锦江牛，体重（400±20） kg，供瘤胃液采集。试验动物单栏饲喂、自由饮水。饲粮精料为玉米-豆粕型，粗料为稻草，精粗比 20:80。每天 08:00 和 17:00 饲喂。采样日于晨喂前采集瘤胃液，4 层灭菌纱布挤压过滤后，分装后迅速放入液氮罐冷冻，-80 ℃保存备用。

1.2　基因组 DNA 提取及 MiSeq 测序

取 0.5 mL 瘤胃液样品进行瘤胃微生物基因组 DNA 的提取，DNA 提取按照天根生化科技(北京)有限公司生产的细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行。采用 NanoDrop-ND1000 测定提取的 DNA 浓度，并利用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量。提取质量合格的 DNA 样品，送上海美吉生物公司对细菌 16S rDNA V4~V5 区（515F~907R）进行测序，测序使用 Illumina MiSeq PE250 测序平台。

1.3　生物信息学分析

对测得的原始数据进行质量控制，舍弃低质量序列（read 尾部碱基质量<20，质控后的 read<50 bp），获得的高质量序列用 Usearch 7.1 软件进行聚类，以 16S rDNA 序列 97%的相似度作为分类操作单元（operational taxonomic unit，OTU）的划分标准。获得的 OTU 与 RDP 数据库（Release 11.1，http://rdp.cme.msu.edu/）比对，通过 RDP Classifier 鉴定 OTU 代表性

序列的微生物分类地位。丰富度指数（Chao，Ace）和多样性指数（Shannon，Simpson）的计算利用 Mothur 1.30.1 软件完成。

2 结 果

2.1 锦江牛瘤胃菌群 α-多样性

经数据前处理，从 3 个样本中获得 56 763 条高质量 16S rDNA 序列，平均长度 393.74 bp，根据序列相似性 97%水平划分得到的 OTU 总数为 946 个。在 OTU 水平，3 个样品的平均丰富度指数 Chao 指数、Ace 指数分别为 836、841，多样性指数 Shannon 指数、Simpson 指数为 4.96、0.021 5。

2.2 锦江牛瘤胃菌群结构

本研究中，锦江牛瘤胃细菌有 15 个门被鉴定，拟杆菌门（Bacteroidetes）（64.37%）、厚壁菌门（Firmicutes）（21.20%）和变形菌门（Proteobacteria）（7.59%）是相对含量最多的菌门（表 1）。其他菌门，如纤维杆菌门（Fibrobacteres）、螺旋体门（Spirochaetes）、黏胶球形菌门（Lentisphaerae）、柔膜菌门（Tenericutes）、疣微杆菌门（Verrucomicrobia）、浮霉菌门（Planctomycetes）、绿弯菌门（Chloroflexi）、互养菌门（Synergistetes）、TM7、迷踪菌门（Elusimicrobia）、蓝菌门（Cyanobacteria）和装甲菌门（Armatimonadetes）也存在所有个体中，但相对含量较低。在纲水平，鉴定出 23 个纲，其中拟杆菌纲（Bacteroidia）和梭菌纲（Clostridia）相对含量最多，分别占总菌的 52.88%和 17.03%。其次是鞘脂杆菌纲（Sphingobacteria）、γ-变形菌纲（Gammaproteobacteria）和 Negativicute。

进一步细化分类水平，仅有 70.29%和 54.26%的序列可以鉴定到科和属。26 个科在所有个体中被鉴定，其中普雷沃氏菌科（Prevotellaceae）（36.26%）、瘤胃菌科（Ruminococcaceae）（9.33%）和毛螺菌科（Lachnospiraceae）（4.89%）相对含量最多，其他优势科，包括鞘脂杆菌科（Sphingobacteriaceae）、理研菌科（Rikenellaceae）、琥珀酸弧菌科（Succinivibrionaceae）、紫单胞菌科（Porphyromonadaceae）和氨基酸球菌科（Acidaminococcaceae）等。在属水平，44 种属在所有样品中被鉴定。普雷沃氏菌属（*Prevotella*）相对含量最多，占总菌的 28.97%。其次是帕拉普氏菌属（*Paraprevotella*）、理研菌属（*Rikenella*）、梭菌_Ⅳ（*Clostridium*_Ⅳ）、解琥珀酸菌属（*Succiniclastium*）和瘤胃球菌属（*Ruminococcus*）。

表 1 锦江牛瘤胃细菌在门、纲、科和属 4 个水平的相对含量

Table 1 Relative abundance of bacteria phylum, class, family and genus in the rumen of *Jinjiang*

cattle %

分类 Classification	相对含量 Relative abundance
拟杆菌门 Bacteroidetes	64.37
拟杆菌纲 Bacteroidia	52.88
普雷沃氏菌科 Prevotellaceae	36.26
普雷沃氏菌属 *Prevotella*	28.97
帕拉普氏菌属 *Paraprevotella*	3.08
紫单胞菌科 Porphyromonadaceae	1.89
Paludibacter	1.17
理研菌科 Rikenellaceae	2.28
理研菌属 *Rikenella*	2.28
鞘脂杆菌纲 Sphingobacteria	7.73
鞘脂杆菌科 Sphingobacteriaceae	3.93
厚壁菌门 Firmicutes	21.20
梭菌纲 Clostridia	17.03
瘤胃菌科 Ruminococcaceae	9.33
梭菌_Ⅳ *Clostridium*_Ⅳ	1.77
醋酸弧菌属 *Acetivibrio*	1.11
瘤胃球菌属 *Ruminococcus*	1.53
毛螺菌科 Lachnospiraceae	4.89
丁酸弧菌属 *Butyrivibrio*	0.81
Negativicutes	2.06
氨基酸球菌科 Acidaminococcaceae	1.62
解琥珀酸菌属 *Succiniclasticum*	1.62
变形菌门 Proteobacteria	7.59
γ-变形菌纲 Gammaproteobacteria	6.12
琥珀酸弧菌科 Succinivibrionaceae	2.03
琥珀酸弧菌属 *Succinivibrio*	0.92

3 讨 论

群落生态学可通过单样品的 OTU 和 α-多样性分析来反映微生物群落的丰度和多样性。本研究通过 MiSeq 测序获得的锦江牛瘤胃细菌 16S rDNA 序列共 56 763 条，划分为 946 个 OTU，低于荷斯坦牛（1 800~2 939）[7-8]及牦牛（6 642）[9]的研究结果。Chao 指数和 Shannon 指数也相对荷斯坦牛和牦牛较低（836 vs. 1 311~4 242 和 4.96 vs. 6.23~8.28）[8-10]。说明锦江牛瘤胃细菌的丰富度和多样性相对较低。瘤胃微生物的多样性是宿主和瘤胃微生物之间强烈选择和协同进化的结果，宿主动物的进化历程的差异可能决定其瘤胃的差异[11]。锦江牛主

产区在江西省西北部、锦江中游，属亚热带湿润气候区，狭窄的分布范围以及温和的气候可能导致其瘤胃菌群丰富度和多样性低。另外，饲粮结构也是影响瘤胃微生物的重要因素。Kobayashi 等[12]研究发现野生动物和半家养动物瘤胃菌群丰富度高于家养动物，认为这是由于野生动物和半家养动物饲料的复杂度相对较大。因此，我们估计饲粮结构的相对单一[以天然牧草（春夏秋）和稻草（冬）为主，冬季补饲少量玉米]可能是引起锦江牛瘤胃菌群丰富度和多样性低的又一重要原因。

在大多数研究中，牛瘤胃中最主要的优势菌群是厚壁菌门，其次是拟杆菌门[9,13-15]。本研究中，锦江牛瘤胃内最主要的优势菌是拟杆菌门（64.37%），厚壁菌门占第 2 位（21.20%）。也有部分关于荷斯坦奶牛的研究结果[7,16]与我们一致，这可能是因为饲粮差异的影响。李亚丹[17]发现持续喂养芒草 18 个月后，湘西黄牛瘤胃中拟杆菌门比例由 16.33%上升到 28.15%，厚壁菌门比例由 68.88%下降到 60.92%。当给安格斯和荷斯坦牛饲喂高纤维的狗牙根时，也发现瘤胃细菌的拟杆菌门增加[10]。低厚壁菌门与拟杆菌门比例可能更常见于高纤维饲粮。与北方牧草相比，南方牧草普遍存在更加易粗老，粗纤维含量高的特点[18]，长期高纤维饲粮可能导致锦江牛瘤胃内拟杆菌门数量增加。

瘤胃微生物在种及亚种的水平上具有较高的多样性，在属的阶元不多。Jami等[7]采集了16头泌乳期的奶牛瘤胃内容物样品，通过焦磷酸测序分析，发现不同个体中有51%的细菌分类相似，核心菌属仅有32个。本研究中，有44个属存在所有个体瘤胃中，其中普雷沃氏菌属是数量最多的属（28.97%）。普雷沃氏菌属遗传多样性高[19-20]，它在瘤胃中发挥着重要作用，是重要的淀粉降解菌，同时还具有降解蛋白质、小肽、多糖等多种代谢产物的能力[21-22]。因此，在牦牛[9]、奶牛[10,15]及其他反刍动物，如驯鹿[23]与山羊[24-25]中，都发现普雷沃氏菌属是瘤胃最重要的菌属。

4 结 论

本研究通过MiSeq高通量测序技术分析了饲喂低精料饲粮的锦江牛瘤胃细菌区系。结果证明，相对其他大品种牛而言，锦江牛瘤胃细菌多样性较低；锦江牛瘤胃中最优势菌门为拟杆菌门（Bacteroidetes），其次是厚壁菌门（Firmicutes）；普雷沃氏菌属（*Prevotella*）是锦江牛瘤胃中最优势细菌属。

参考文献：

[1] BÄCKHED F,LEY R E,SONNENBURG J L,et al.Host-bacterial mutualism in the human intestine[J].Science,2005,307(5717):1915–1920.

[2] 刘开朗,卜登攀,王加启,等.六个不同品种牛的瘤胃微生物群落的比较分析[J].中国农业大学学报,2009,14(1):13–18.

[3] ECKBURG P B,BIK E M,BERNSTEIN C N,et al.Diversity of the human intestinal microbial flora[J].Science,2005,308(5728):1635–1638.

[4] 石鹏君,柏映国,袁铁铮,等.应用rpoB和16S rDNA基因的变性梯度凝胶电泳技术对山羊瘤胃细菌多样性的研究[J].微生物学报,2007,47(2):285–289.

[5] DE LA FUENTE G,BELANCHE A,ABECIA L,et al.Rumen protozoal diversity in the Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) as compared with domestic goats (*Capra hircus*)[J].European Journal of Protistology,2009,45(2):112–120.

[6] SHI P J,MENG K,ZHOU Z G,et al.The host species affects the microbial community in the goat rumen[J].Letters in Applied Microbiology,2008,46(1):132–135.

[7] JAMI E,MIZRAHI I.Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals[J].PLoS One,2012,7(3):e33306.

[8] ASMA Z,SYLVIE C,LAURENT C,et al.Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets[J].FEMS Microbiology Ecology,2013,83(2):504–514.

[9] GUO W,LI Y,WANG L Z,et al.Evaluation of composition and individual variability of rumen microbiota in yaks by 16S rRNA high-throughput sequencing technology[J].Anaerobe,2015,34:74–79.

[10] PITTA D W,PINCHAK W E,DOWD S E,et al.Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from Bermudagrass hay to grazed winter wheat diets[J].Microbial Ecology,2010,59(3):511–522.

[11] 裴彩霞,毛胜勇,朱伟云.山羊瘤胃产甲烷古菌多样性及与其他动物瘤胃的比较[J].畜牧兽医学报,2012,43(6):909–914.

[12] KOBYASHI Y.Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology:need for basic and applied

science[J].Animal Science Journal,2006,77(4):375–385.

[13] LENG J,CHENG Y M,ZHANG C Y,et al.Molecular diversity of bacteria in Yunnan yellow cattle (*Bos taurs*) from *Nujiang* region,China[J].Molecular Biology Reports,2012,39(2):1181–1192.

[14] PETRI R M,SCHWAIGER T,PENNER G B,et al.Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge[J].PLoS One,2013,8(12):e83424.

[15] PINLOCHE E,MCEWAN N,MARDEN J P,et al.The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle[J].PLoS One,2013,8(7):e67824.

[16] LI R W,WU S,BALDWIN R T,et al.Perturbation dynamics of the rumen microbiota in response to exogenous butyrate[J].PLoS One,2012,7(1):e29392.

[17] 李亚丹.芒草驯养湘西黄牛(*Bos taurus*)瘤胃微生物多样性及β-葡萄糖苷酶新基因的克隆与表达研究[D].博士学位论文.长沙:湖南农业大学,2012.

[18] 杜占池,杜菁昀.我国不同自然区域天然牧地和人工牧地营养价值的比较研究[J].中国草地,2003,5(1):232–276.

[19] RAMŠAK A,PETERKA M,TAJIMA K,et al.Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum[J].FEMS Microbiology Ecology,2000,33(1):69–79.

[20] BEKELE A Z,KOIKE S,KOBAYASHI Y.Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* arevealed by 16S rRNA gene-based analysis[J].FEMS Microbiology Letters,2010,305(1):49–57.

[21] GARDNER R G,WELLS J E,RUSSELL J B,et al.The cellular location of *Prevotella* ruminicola beta-1,4-*D*-endoglucanase and its occurrence in other strains of ruminal bacteria[J].Applied and Environmental Microbiology,1995,61(9):3288–3292.

[22] KRAUSE D O,DENMAN S E,MACKIE R I,et al.Opportunities to improve fiber degradation in the rumen:microbiology,ecology,and genomics[J].FEMS Microbiology Reviews,2003,27(5):663–693.

[23] GRUNINGER R J,SENSEN C W,MCALLISTER T A,et al.Diversity of rumen bacteria in Canadian cervids[J].PLoS One,2014,9(2):e89682.

[24] 刘晶.饲料果胶对瘤胃微生物菌群结构和微生物蛋白合成影响的研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2014.

[25] HUO W J,ZHU W Y,MAO S Y.Impact of subacute ruminal acidosis on the diversity of liquid and solid-associated bacteria in the rumen of goats[J].World Journal of Microbiology and Biotechnology,2014,30(2):669–680.

Analysis of Rumen Bacterial Diversity in *Jinjiang* Cattle Using MiSeq Sequencing Technology

GAO Yufei　OUYANG Kehui*　QU Mingren　XIONG Xiaowen　WEN Qingqi　XU Lanjiao

（*Jiangxi Province Key Laboratory of Animal Nutrition*, *Engineering Research Center of Feed Development*, *Jiangxi Agricultural University, Nanchang* 330045, *China*）

Abstract: The present study was designed to reveal the rumen bacterial diversity in *Jinjiang* cattle using MiSeq high-flux sequencing technology. Ruminal liquid samples were obtained from three *Jinjiang* cattles (bull) weighted (400±20) kg with permanent rumen cannulas. Total DNA was extracted and the 16S rDNA V4~V5 of bacteria was sequenced by MiSeq sequencing technology. The abundance, distribution and α-diversity index of species were analyzed. The results showed that a total of 56 763 valid 16S rDNA sequences and 946 OTU across 3 samples were obtained. The richness indexes, Chao and Ace indexes, of ruminal bacterial were 836 and 841, respectively; and alpha diversity indexes, Shannon and Simpson indexes were 4.96 and 0.021 5, respectively. 15 phyla, 23 classes, 26 families and 44 genera were identified via taxonomic summary. The dominant phyla among them were Bacteroidetes (64.37%), Firmicutes (21.20%) and Proteobacteria (7.59%). The most abundant classes were Bacteroidia (52.88%), Clostridia (17.03%), and Prevotellaceae (36.26%). Ruminococcaceae (9.33%) and Lachnospiraceae (4.89%) were the predominant family. At genus level, the high abundance of genera were *Prevotella* (28.97%), *Paraprevotella* (3.08%), *Rikenella* (2.28%), *Clostridium*_Ⅳ (1.77%), *Succiniclastium* (1.62%) and *Ruminococcus* (1.53%). In conclusion, the diversity of rumen bacterial community in

*Corresponding author, professor, E-mail: ouyangkehui@sina.com　　（责任编辑　王智航）

Jinjiang cattle is low. Bacteroidetes is the predominant phylum and Firmicutes is the second most abundant phylum. *Prevolla* is the most abundant genus in the rumen bacterial community.

Key words: *Jinjiang* cattle; rumenal bacteria; diversity; MiSeq sequencing